



DISSEMINAÇÃO DE LEVEDURAS COMERCIAIS EM ECOSSISTEMAS VITIVINÍCOLAS

D. Schuller ^{1*}, H. Alves¹, S. Dequin ² e M. Casal ¹

***¹ Centro de Biologia
Universidade do Minho
Portugal***

***² Institut National de la
Recherche Agronomique
UMR Sciences pour l'Oenologie
France.***



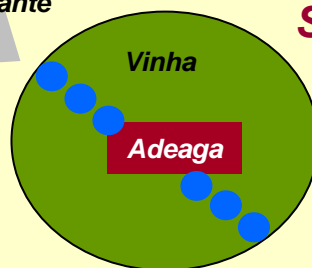
Critérios adoptados para a selecção de adegas e de pontos de amostragem

Rastreio de leveduras comerciais que foram utilizadas durante os últimos 5 anos :

Zymaflore VL1, (Lallemand)



Vento predominante



Situação ideal

● **Ponto de amostragem**

Recolha de uvas da vinha circundante à adega (20 m – 1000 m), em função de circunstâncias locais

Amostragens pré- e pós- vindima para a avaliação da permanência/disseminação imediata de leveduras comerciais

3 vinhas x 6 pontos de amostragem x 2 campanhas de amostragem x 2anos

72 amostras

Região Demarcada dos Vinhos Verdes

Monção

Ponte de Lima

Baião



Amostragem e isolamento de leveduras

Recolha de 2 kg de uvas de cada local

Esmagamento

Fermentação (200 – 500 ml, 20° C; agitação)

***Determinação da perda de CO₂
(diminuição do peso)***

***Quando a perda de peso atingiu 70 g/l
(corresponde ao consumo de 2/3 do teor de açúcares)
Plaqueamento de mosto diluído em placas com meio
YPD***

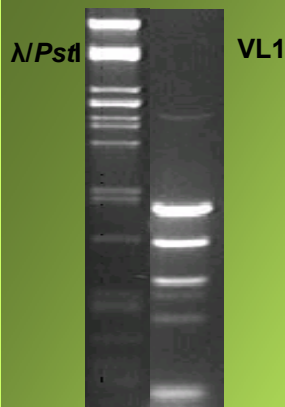
***Incubação:
28°C, 48 horas***

Seleccção aleatória de 30 colónias

Identificação dos isolados



Análise de sequências inter-delta (Ness et al., 1993)

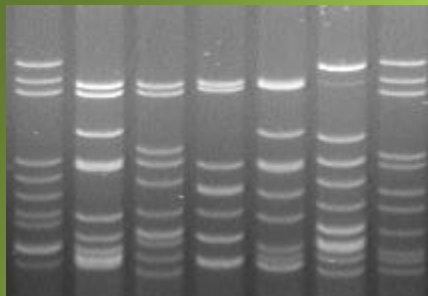


Problemas:

*Baixo poder de discriminação
Perfil de amplificação pode variar com a quantidade de DNA molde*

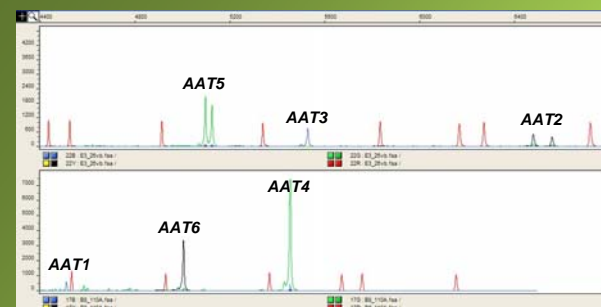
Análise detalhada

mt DNA RFLP (Querol et al., 1992)



Exemplos de perfis de restrição (*Hinf* I) de DNA mitocondrial de estirpes que apresentam o mesmo perfil de amplificação de sequências inter-delta como a estirpe Zymaflore VL1

Análise de 6 loci de Microssatélites (Pérez et al., 2001)



2 reacções multiplex:

AAT1	FAM	145-246 pb
AAT4	TET	278-335 pb
AAT6	HEX	249-267 pb
AAT2	HEX	370-406 pb
AAT3	FAM	247-445 pb
AAT5	TET	216-225 pb

TOTAL: 930 isolados

20 perfils

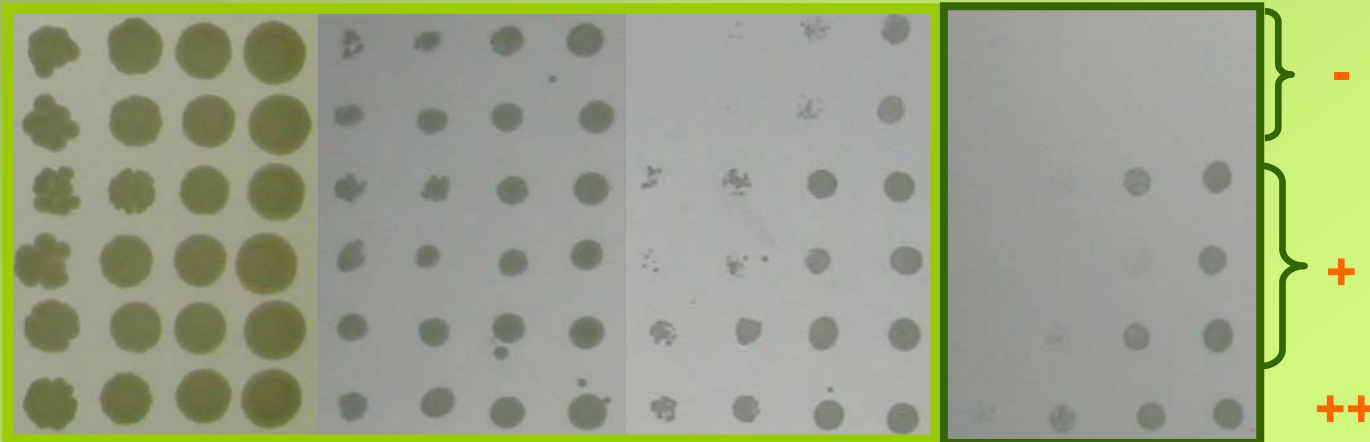
ca. 150 perfis

ca. 150 perfis



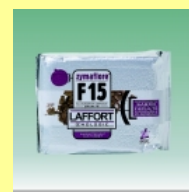
YNB com glucose (2 %, p/v), ácido acético (0,25 %, v/v) e etanol, pH 4,0

6 % (v/v) etanol 8 % (v/v) etanol 10 % (v/v) etanol



Classificação de 23 leveduras comerciais

Estirpe	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
Crescimento	++	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	++	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+



Vitis vinifera L.

2001

12 amostras
8 fermentações espont.
240 isolados,
100 % *Saccharomyces* sp.

Zymaflore VL 1

4: 3.3 % 22: 90 %
23: 7 %

Zymaflore F10

21: 30 %
4: 3 %
5: 3 % 23: 3 %

ICV D254

20: 3 %
21: 13 %
4: 3 % 22: 10 %
5: 7 % 23: 83 %
24: 43 %

Zymaflore F 15

21: 53 %
4: 87 %
5: 70 % 23: 7 %
6: 100 % 24: 7 %

Zymaflore VL 1
Zymaflore F10
Zymaflore VL 3
Zymaflore F15
Lalvin QA23
Lalvin CY 3079
ICV D47
ICV D254
Uvaferm Bdx
Uvaferm ALB
Uvaferm 228

Vento predominante

adega

Riacho

100 m

1
19

2
20

3
21

4
22

5
23

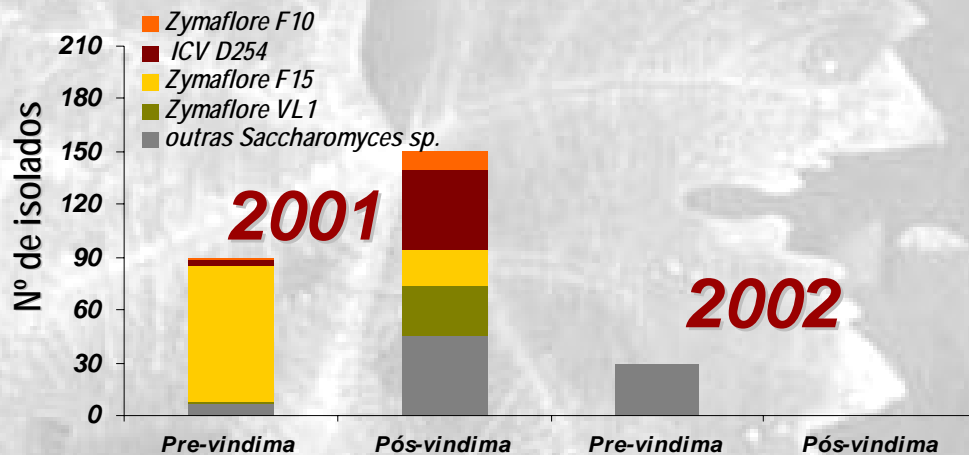
6
24

2002

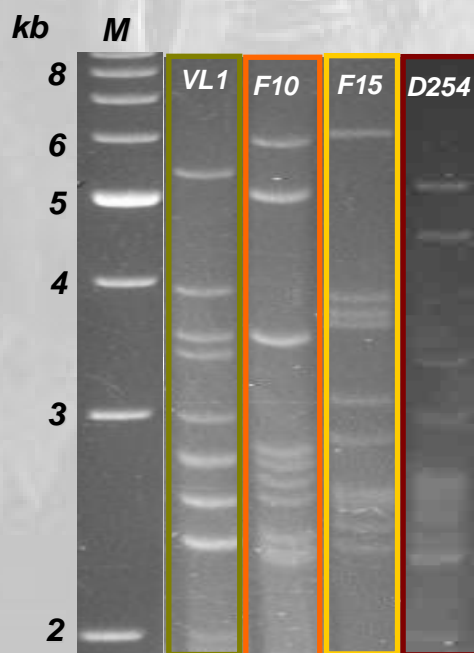
3 amostras
1 fermentação espont. (4)
30 isolados,
100 % *Saccharomyces* sp.

Ausência de leveduras comerciais

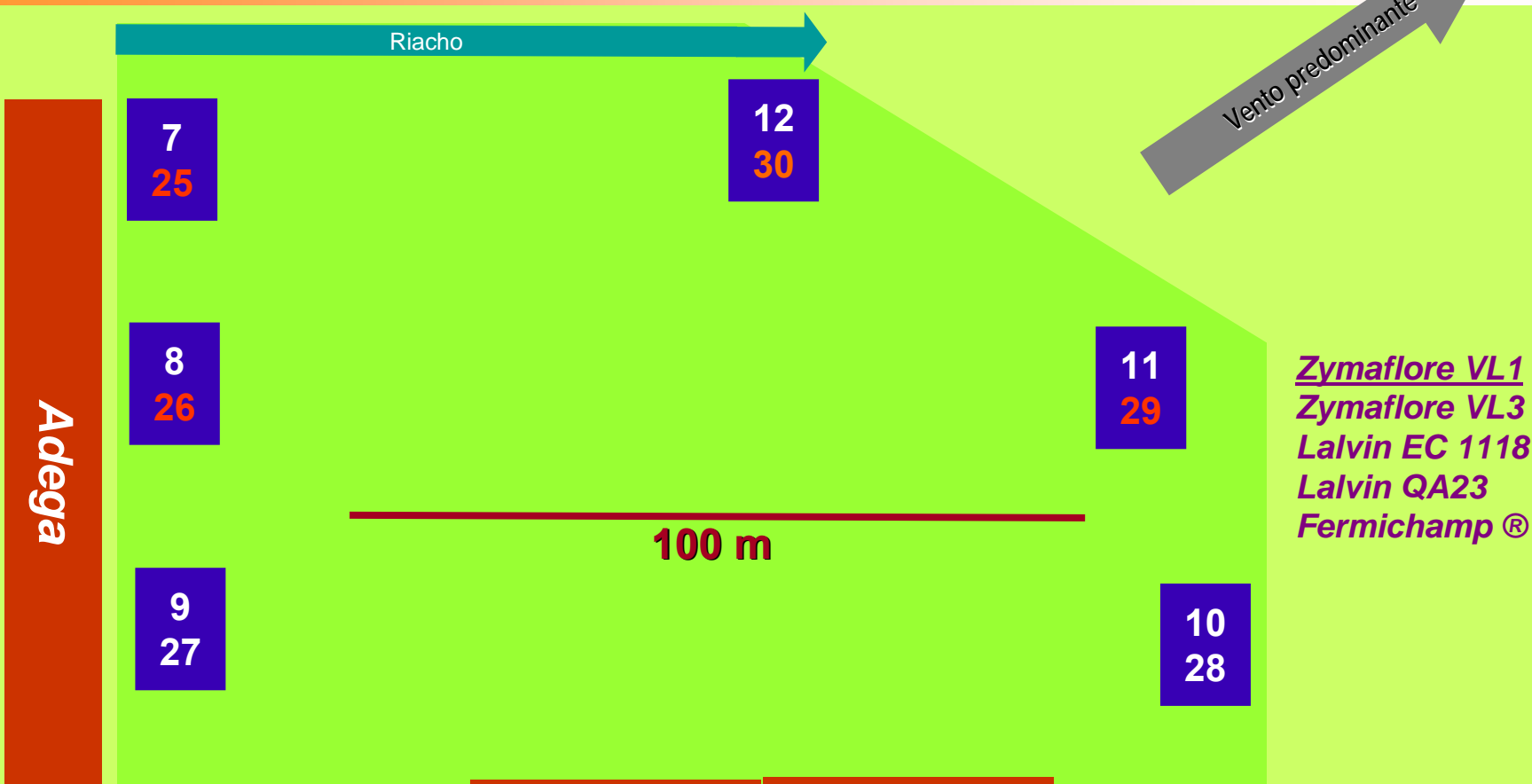
270 isolados \Rightarrow 33 perfis genéticos



Nº de estirpes	Crescimento	Percentagem
15	-	44 %
17	+	52 %
1	++	4 %



	VL1	F10	F15	D254
AAT1	204/219	195	201	195
AAT2	372/381	378	378	371
AAT3	265	265	247	241
AAT4	329	329	329	332
AAT5	219/222	222	222	219
AAT6	256/259	256	256	256



2001

12 amostras
 8 fermentações espont.
 240 isolados,
 100 % *Saccharomyces sp.*

Zymaflore VL 1

25: 73 %
 26: 17 %
 30: 30 %

Lalvin QA23

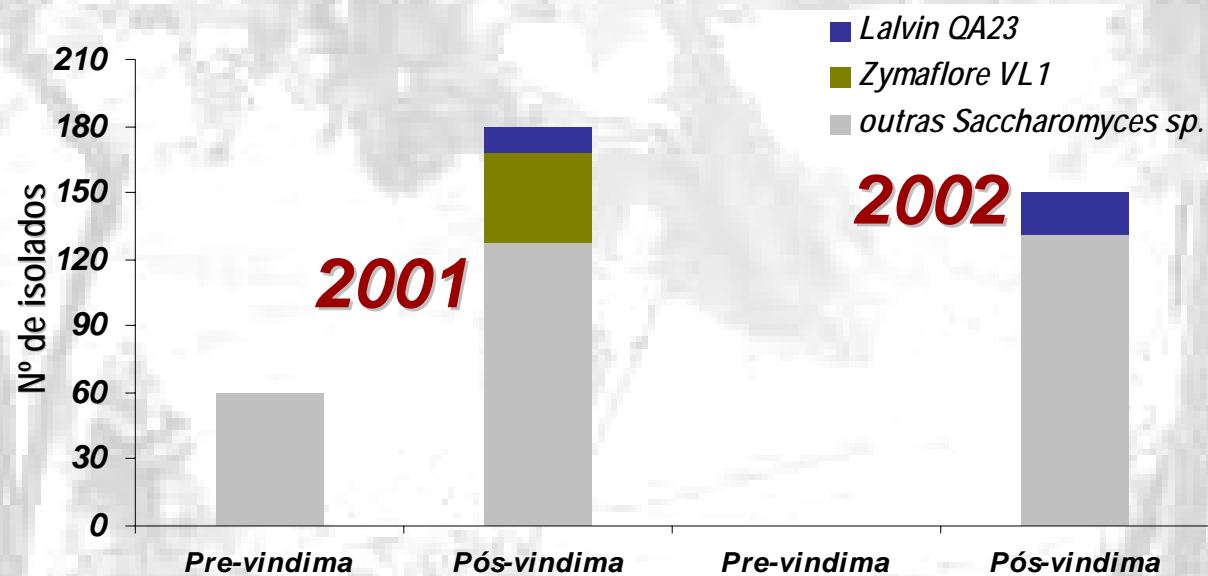
25: 10 %
 26: 23 %
 30: 3 %

2002

9 amostras
 5 fermentações espont.
 150 isolados,
 100 % *Saccharomyces sp.*

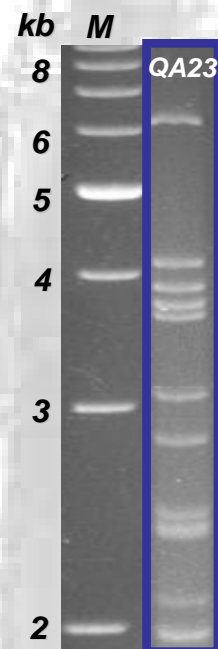
Lalvin QA23

26: 23 %
 29: 40 %

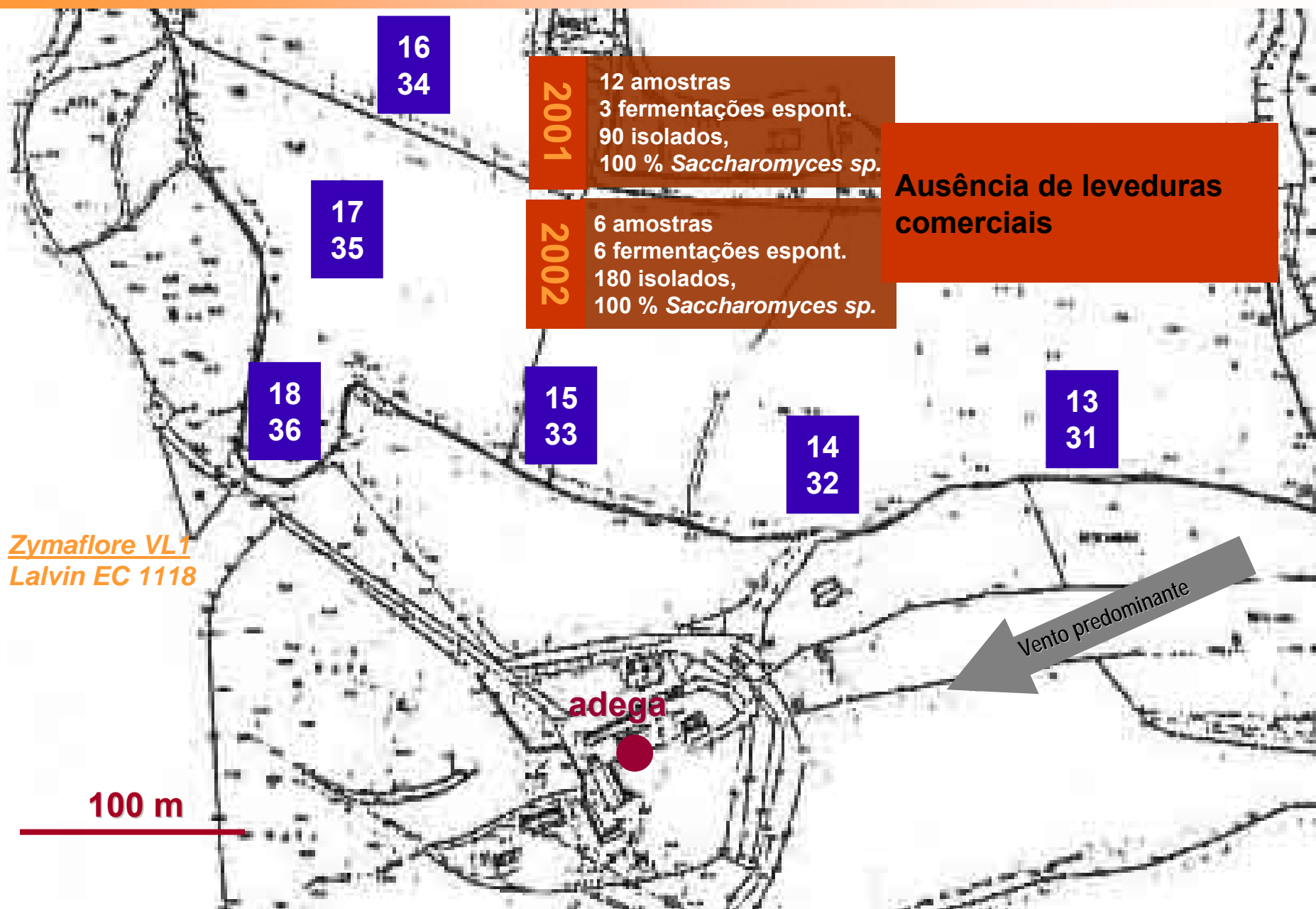


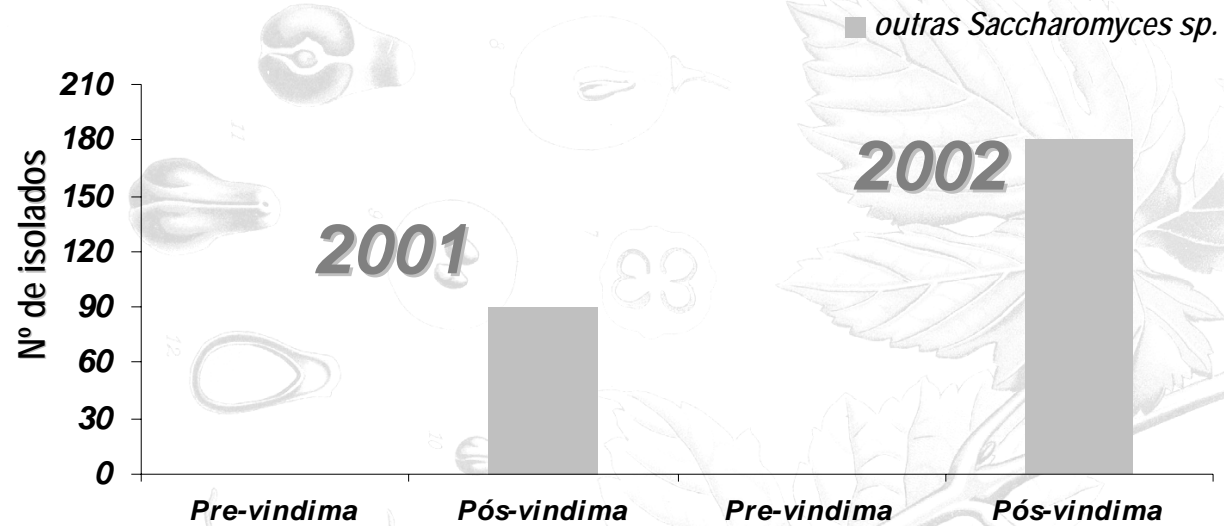
390 isolados → 78 perfis genéticos

Nº de estirpes	Crescimento	Percentagem
30	-	38 %
38	+	49 %
11	++	14 %



	QA23
AAT1	189/237
AAT2	375
AAT3	250/347
AAT4	302
AAT5	219/222
AAT6	250/256

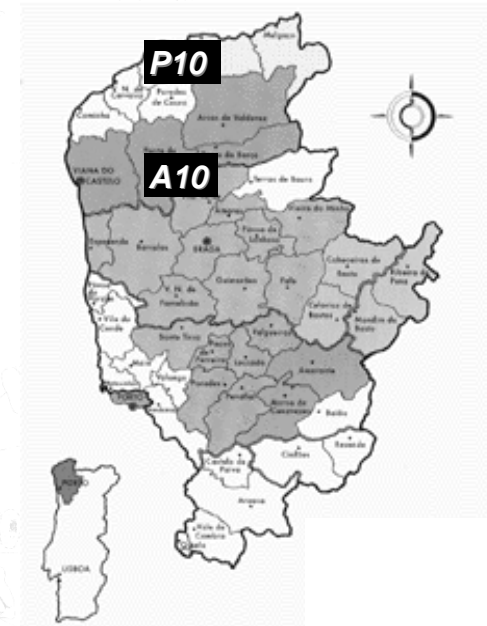
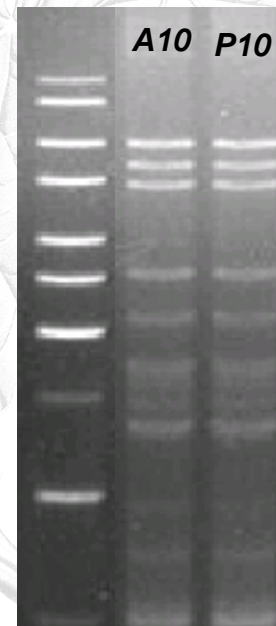




Crescimento: +

270 isolados \Rightarrow 51 perfis genéticos

Nº de estirpes	Crescimento	Percentagem
9	-	17 %
36	+	70 %
7	++	13 %



A disseminação de leveduras comerciais

- ✓ *Pode ser detectada maioritariamente nas proximidades da adega (20 - 40m);*
- ✓ *Não é detectada em locais situados a mais de 150 m da adega;*
- ✓ *Pode depender da levedura comercial. Estirpes distintas podem possuir diferentes capacidades de sobrevivência em função do ecossistema específico de cada adega;*
- ✓ *É favorecida em locais de escoamento de água proveniente da adega, sendo esta um potencial vector.*
- ✓ *Pode variar em anos consecutivos e pode ser dependente das condições climáticas.*



A disseminação de estirpes de leveduras comerciais ocorre num espaço e tempo muito limitado.

Aspectos fisiológicos

Os isolados correspondentes aos 150 perfis genéticos possuem capacidade de crescimento em meio YNB contendo etanol (10%, v/v) e ácido acético (0,25 %, v/v) muito semelhante à estirpes comerciais;

- | | |
|------------------------------|----|
| ✓ xxx estirpes (yyy%) | ++ |
| ✓ xxx estirpes (yyy%) | + |
| ✓ xxx estirpes (yyy%) | - |

Continuação ...

“screening” dos isolados correspondentes aos 150 perfis genéticos:

- ✓ Capacidade de consumo de ácido acético e de ácido málico
- ✓ Produção de ácido acético
- ✓ Produção de H_2S